

ВЛИЯНИЕ ПИЩЕВОЙ ДОБАВКИ E407a НА МЕТАБОЛИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК РАЗЛИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

ТКАЧЕНКО А.С.¹, ПРОКОПЮК В.Ю.^{1,2}, ОНИЩЕНКО А.И.¹

¹Харьковский национальный медицинский университет, г. Харьков, Украина

²Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины, г. Харьков, Украина

Вестник ВГМУ. – 2021. – Том 20, №4. – С. 38-45.

THE IMPACT OF THE FOOD ADDITIVE E407A ON THE METABOLIC ACTIVITY OF DIFFERENT CELL CULTURES

TKACHENKO A.S.¹, PROKOPIUK V.Yu.^{1,2}, ONISHCHENKO A.I.¹

¹Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

²Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

Vestnik VGMU. 2021;20(4):38-45.

Резюме.

Целью работы было изучить влияние различных концентраций пищевой добавки E407a (полуочищенный каррагинан) на метаболическую активность клеток фетальной печени, спленоцитов и клеток костного мозга.

Материал и методы. Клеточные культуры фетальной печени, спленоцитов и костного мозга инкубировали с пищевой добавкой E407a в концентрациях от 0 мг/мл до 10 мг/мл в течение 24 часов (n=8). Для анализа влияния добавки на метаболическую активность клеток использовали колориметрический МТТ тест, основанный на способности живых, метаболически активных клеток превращать 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолий бромид в формазан. Статистическую обработку данных проводили с помощью расчета критериев Краскела-Уоллиса и Данна.

Результаты. Установлено, что наиболее чувствительной к каррагинану клеточной культурой является костный мозг. Более чем двухкратное статистически достоверное ($p < 0,0001$) повышение метаболической активности клеток костного мозга наблюдалось при использовании от 200 мкг/мл E407a. Метаболическая активность спленоцитов увеличивалась приблизительно в 1,5 раза и более ($p < 0,0001$) при использовании каррагинанов в концентрации 500 мкг/мл и выше. Клетки фетальной печени оказались наиболее устойчивыми к прямому токсическому действию пищевой добавки E407a.

Закключение. Пищевая добавка E407a цитотоксична по отношению к клеткам костного мозга и спленоцитам в концентрациях соответственно от 200 мкг/мл и 500 мкг/мл.

Ключевые слова: клетки фетальной печени, спленоциты, клетки костного мозга, МТТ тест.

Abstract.

Objectives. To study the effects of various concentrations of the food additive E407a (semi-refined carrageenan) on the metabolic activity of fetal liver cells, splenocytes, and bone marrow cells.

Material and methods. Fetal liver, splenocytes and bone marrow cell cultures were incubated with the food additive E407a at concentrations varying from 0 mg/ml to 10 mg/ml for 24 hours (n=8). To analyze the effects of this food additive on the metabolic activity of cells, a colorimetric MTT assay was used. It is based on the ability of viable, metabolically active cells to convert 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide into formazan. The data were statistically processed using Kruskal-Wallis and Dunn's criteria.

Results. The bone marrow cell culture was found to be the most sensitive to carrageenan. More than a twofold statistically significant ($p < 0.0001$) increase in the metabolic activity of bone marrow cells was observed when using E407a from 200 µg/ml and above. The metabolic activity of splenocytes increased approximately 1.5 times and over ($p < 0.0001$) when

using carrageenans at the concentration of 500 µg/ml and higher. Fetal liver cells turned out to be the most resistant to the direct toxic effect of the food additive E407a.

Conclusions. The food additive E407a is cytotoxic to bone marrow cells and splenocytes at concentrations of 200 µg/ml and 500 µg/ml, respectively.

Key words: fetal liver cells, splenocytes, bone marrow cells, MTT assay.

Пищевые добавки – это вещества естественного или искусственного происхождения, которые используются в пищевой промышленности для улучшения текстуры продуктов, увеличения срока хранения, улучшения вкусовых качеств и внешнего вида продуктов питания. Расширяющийся ассортимент и увеличение количества потребляемых пищевых добавок обуславливают интерес к всестороннему изучению безопасности добавок, используемых в пищевой промышленности. В частности, регулирующий орган Европейского Союза – Европейское агентство по безопасности пищевых продуктов (EFSA) – инициировало программу по пересмотру профилей безопасности уже одобренных пищевых добавок. Внимание данной организации привлекла одна из наиболее спорных пищевых добавок, а именно каррагинан, который представляет собой фикоколлоид гетерополисахаридной природы, получаемый из красных морских водорослей. Каррагинаны используются в качестве загустителей, гелеобразователей и эмульгаторов, и зарегистрированы как пищевые добавки E407 (нативный каррагинан) и E407a (полуочищенный каррагинан) [1].

В последнее время среднегодовое потребление каррагинана значительно увеличилось, что обусловлено его дешевизной, доступностью и относительной легкостью экстракции из водорослей в коммерческом масштабе. Содержание E407 и E407a в продуктах питания значительно колеблется, достигая максимальных показателей в 0,5-1% в некоторых продуктах мясного и молочного ассортимента [2].

На текущий момент каррагинаны признаны безопасными и их потребление не регламентируется. Однако многочисленные эксперименты на лабораторных животных, клеточных культурах и даже несколько клинических исследований демонстрируют токсичность пищевого каррагинана, в частности способность индуцировать или усиливать воспаление кишечника [3, 4]. Известно, что патогенез каррагинан-индуцированного воспаления кишечника многофакторный. Показано,

что каррагинаны способны ингибировать протеолиз, снижая активность пепсина и трипсина, тем самым уменьшая биодоступность пищевых белков [2]. Еще одним фактором, обуславливающим токсичность каррагинанов, является увеличение проницаемости кишечника и, как следствие, нарушение его барьерной функции [2]. В последнее время в большом количестве работ показана способность каррагинанов усиливать течение воспалительного процесса в желудочно-кишечном тракте путем влияния на микробиоту [3, 5]. При анализе молекулярных механизмов воздействия каррагинана на клетки установлено, что данная пищевая добавка может индуцировать синтез провоспалительных цитокинов посредством активации TLR4- и NF-κB-зависимых путей, влиять на редокс-гомеостаз клеток и активировать NLRP3-зависимый инфламмасомный провоспалительный путь [6-8]. При этом продемонстрировано, что эффекты, которые каррагинан оказывает на клетки, зависят от различных факторов: вида полисахарида, молекулярной массы, структурной конформации и концентрации добавки; типа клеток и сроков воздействия; использования монокультуры или комбинации различных клеточных культур в эксперименте [2]. Анализ литературы показал, что влияние каррагинана на клетки печени, спленоциты и клетки костного мозга изучено слабо.

Целью работы было изучение влияния различных концентраций полуочищенного каррагинана на метаболическую активность клеточных культур для оценки прямой цитотоксичности данной пищевой добавки.

Материал и методы

Для выделения клеток использовали 8 крыс линии WAG весом 180-200 г. и 8 плодов крыс в сроке гестации 19-20 дней. Животных содержали в стандартных условиях вивария. На заседании Комиссии по биоэтике Харьковского национального медицинского университета (г. Харьков, Украина) был рассмотрен и одобрен протокол

эксперимента. Манипуляции с лабораторными животными проводились в строгом соответствии с «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и иных научных целях» (ETS 123).

Клетки костного мозга крыс получали из бедренной кости [9]. Выделяли бедренные кости крыс, отделяли эпифиз и диафиз, после чего из кости шприцом вымывали костный мозг, фильтровали через клеточный фильтр с размерами пор 100 мкм, ресуспендировали в среде RPMI 1640, обогащенной 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS, Lonza, Германия) и антибиотиком-антимикотиком.

Спленоциты получали из селезенки животных по методу, описанному ранее [10, 11]. Для этого селезенку удаляли, паренхиму осторожно отделяли от капсулы, фрагментировали, фильтровали через клеточный фильтр с размерами пор 100 мкм. Клеточную суспензию отмывали и ресуспендировали в среде RPMI 1640 (BioWest, Франция), обогащенной 10% FBS, а также антибиотиком-антимикотиком. Клетки подсчитывали

в гемоцитометре, а их жизнеспособность определяли с помощью трипанового синего.

Клетки печени эмбрионов крыс выделяли энзиматическим методом [12]. Печень эмбрионов крыс отделяли, фрагментировали, инкубировали в растворе 0,05% коллагеназы типа А (Herbi, Германия) и 0,05% ДНКазы (Sigma, США) в течение 60 минут на магнитной мешалке при 37°C, после чего фильтровали через клеточный фильтр (100 мкм), отмывали в среде DMEM (BioWest, Франция), обогащенной 10% FBS. Клетки высевали на 25 см² культуральные флаконы (SPL, Республика Корея). После достижения 100% конfluence-ности клетки снимали с помощью 0,25% трипсина-ЭДТА и пересевали в соотношении 1:2. В работе использовали клетки 3-4 пассажей.

Полученные клеточные культуры представлены на рисунке 1.

МТТ тест проводили со спленоцитами, клетками костного мозга и клетками фетальной печени. Метод базируется на способности живых клеток метаболизировать тетразолиевый краситель 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-

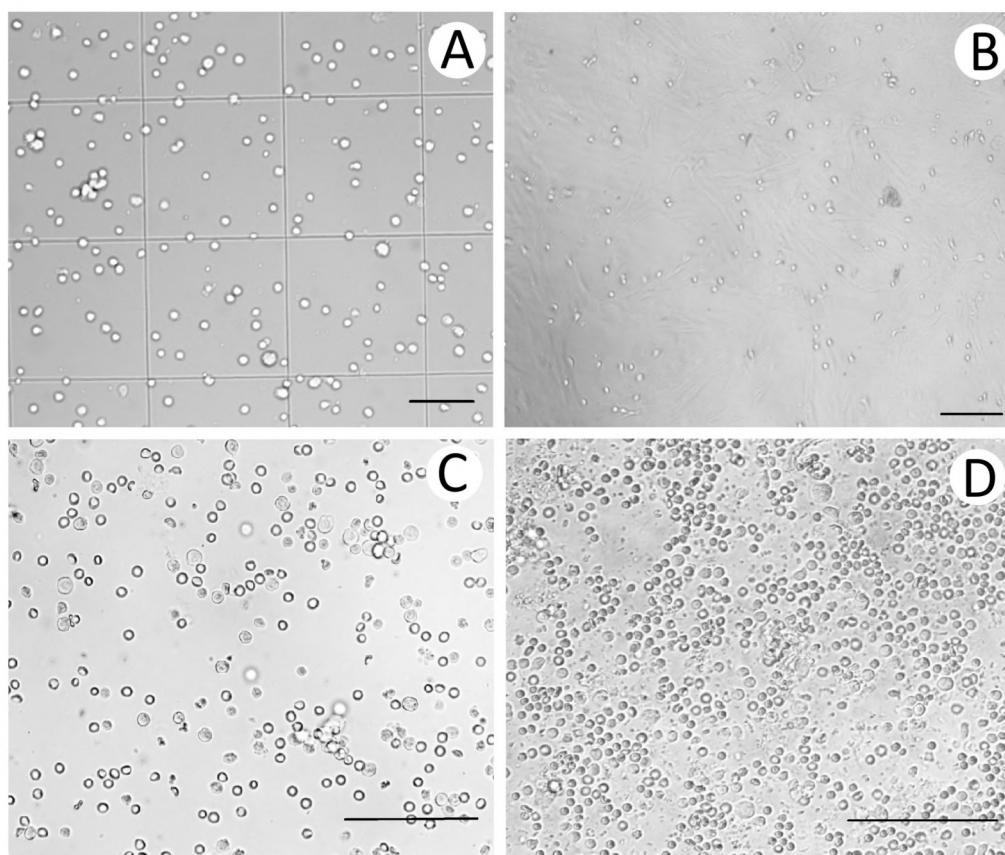


Рисунок 1 – Клетки печени эмбриона крыс (А - суспензия; В - монослой), спленоциты (С) и клетки костного мозга (D). Фазовый контраст. Масштаб линейки - 100 мкм.

тетразолий бромид в формаза [13]. Спленоциты пересевали на 96-луночный планшет (SPL, Республика Корея) в концентрации 7×10^4 на лунку. Клетки костного мозга пересевали в концентрации 4×10^4 на лунку. Клетки печени пересевали в концентрации $1,5 \times 10^4$ на лунку и оставляли на сутки для адгезии.

Клетки культивировали с пищевой добавкой E407a в конечной концентрации 10 мкг/мл, 25 мкг/мл, 50 мкг/мл, 100 мкг/мл, 200 мкг/мл, 500 мкг/мл, 1 мг/мл, 5 мг/мл и 10 мг/мл в течение 24 часов в CO_2 -инкубаторе (Thermo Fisher Scientific, США) при температуре 37°C в атмосфере с 5% CO_2 . В качестве контрольных образцов использовали клетки, в которые не добавляли полуочищенный каррагинан, и клетки, предварительно убитые 70% этанолом. После инкубации среду в каждой лунке меняли на 0,1 мл среды культивирования с 15 мкл МТТ в концентрации 5 мг/мл, инкубировали 3 часа в CO_2 -инкубаторе при 37°C в атмосфере с 5% CO_2 . Затем среду отбирали, добавляли по 0,1 мл диметилсульфоксида с додецилсульфатом натрия, инкубировали 1 час при 37°C для растворения формаза. Адсорбцию измеряли при длине волны 570 нм. Результат выражен в условных единицах оптической плотности (УЕОП).

Расчет мощности выборки проводили с помощью программы «G*Power 3» с установленными значениями планируемой мощности исследования (0,8) и ошибки I рода (5%).

Полученные данные обрабатывали с помощью программы «Graph Pad Prism 5.0». Проверку нормальности распределения осуществляли путем расчета критерия Шапиро-Уилка. Независимые группы показателей сравнивали с использованием непараметрических критериев Краскела-Уоллиса и Данна. Метод Бенджамини-Хохберга использовали для контроля ожидаемой доли ложных отклонений. Разница считалась статистически достоверной при $p < 0,05$.

Результаты

В ходе исследования установлено, что клетки костного мозга являются наиболее чувствительными к действию пищевой добавки E407a по сравнению с другими клеточными культурами, которые использовались в данном эксперименте. В частности, статистически достоверные ($p < 0,0001$) изменения показателей оптической плотности суспензий клеток костного мозга наблюдались при

концентрации E407a, равной 200 мкг/мл. В диапазоне концентраций 200 мкг/мл – 5 мг/мл медицинские значения оптической плотности в опытных образцах превышали аналогичный показатель контрольной группы более чем в 2 раза (рис. 2). В то же время, трехкратное статистически достоверное ($p < 0,0001$) увеличение оптической плотности суспензий по сравнению с контрольными образцами наблюдалось при инкубации с E407a в конечной концентрации 10 мг/мл.

Похожие, однако менее выраженные, эффекты прямого воздействия полуочищенного каррагинана были характерны и для суспензии спленоцитов. Статистически достоверное увеличение оптической плотности суспензий приблизительно в 1,8 раза наблюдалось для следующих концентраций E407a: 500 мкг/мл, 1 мг/мл и 5 мг/мл. Инкубация в концентрации до 500 мкг/мл не приводила к статистически достоверному изменению показателя, характеризующего метаболическую активность клеток. В то же время, инкубация с максимальным содержанием каррагинана в данном эксперименте (10 мг/мл) в течение 24 часов приводила к более чем четырехкратному увеличению показателей оптической плотности по сравнению с суспензиями клеток селезенки, которые не подвергались воздействию пищевой добавки (рис. 3).

При инкубации полуочищенного каррагинана с культурой фетальных клеток печени крыс выявлено, что пищевая добавка не оказывает влияние на метаболическую активность клеток вне зависимости от концентрации, о чем свидетельствует отсутствие статистически достоверных ($p > 0,05$) изменений медианных значений оптической плотности клеточных суспензий (рис. 4).

Обсуждение

Известно, что МТТ используется для оценки метаболической активности митохондрий и косвенно отражает жизнеспособность клеток, поскольку в метаболически активных клетках соли тетразолия превращаются в формаза под действием митохондриальных дегидрогеназ, в первую очередь сукцинатдегидрогеназы [13, 14].

Полученные результаты указывают на тот факт, что низкие концентрации пищевой добавки E407a (100 мкг/кг и ниже) не влияют на метаболическую активность различных клеточных культур и, как следствие, не оказывают цитотоксического воздействия. Наши данные подтверж-

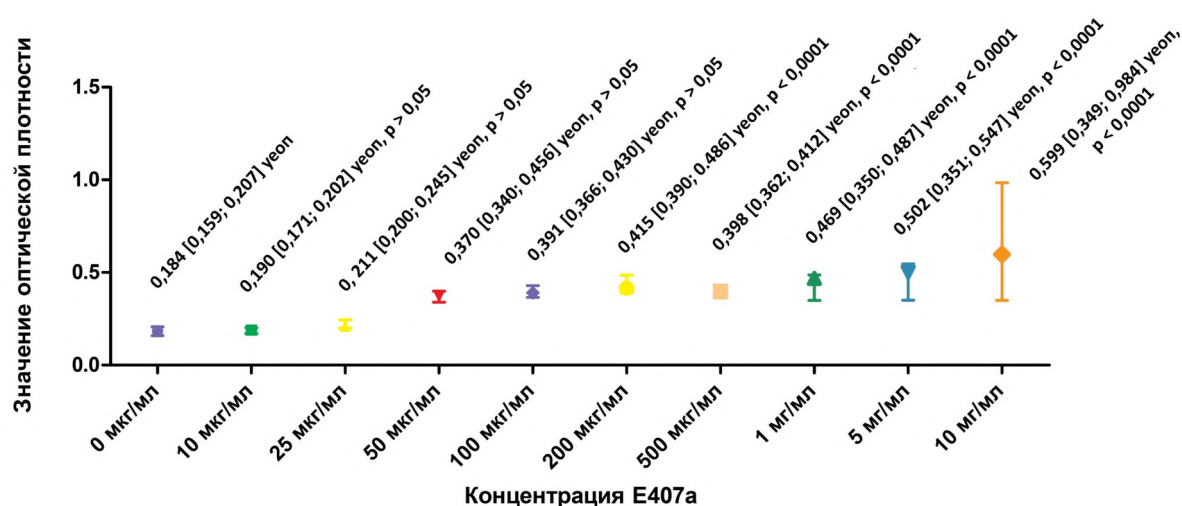


Рисунок 2 – МТТ тест. Показатели оптической плотности суспензии клеток костного мозга крыс, инкубированных в течение 24 часов с пищевой добавкой E407a в концентрациях от 0 до 10 мг/кг. Числовые значения представлены в условных единицах оптической плотности (УЕОП).

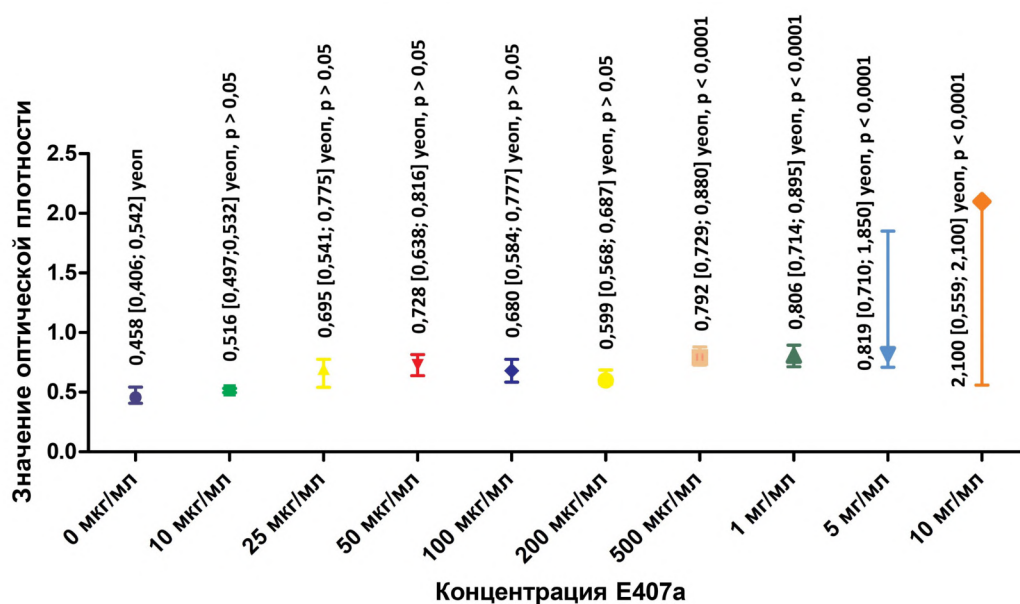


Рисунок 3 – МТТ тест. Сравнение показателей оптической плотности суспензии спленоцитов крыс, которые были инкубированы с пищевой добавкой E407a в концентрациях от 0 до 10 мг/кг в течение 24 часов. Числовые значения представлены в условных единицах оптической плотности (УЕОП).

дают полученные ранее результаты, которые свидетельствуют об отсутствии прямого цитотоксического действия различных видов каррагинана на клетки кишечника и печени человека в низких концентрациях [15]. Поскольку в данном эксперименте не наблюдалось снижения числовых значений показателя МТТ теста, можно сделать вывод об отсутствии отрицательного влияния E407a на жизнеспособность клеток.

В то же время, при воздействии высоких концентраций полуочищенного каррагинана на культуры клеток селезенки и костного мозга наблюдалось повышение метаболической активности клеток. Следует отметить, что клетки костного мозга оказались более чувствительными к действию пищевой добавки. Однако способность клеток превращать МТТ в формазан после инкубации с пищевой добавкой E407a зависит от типа

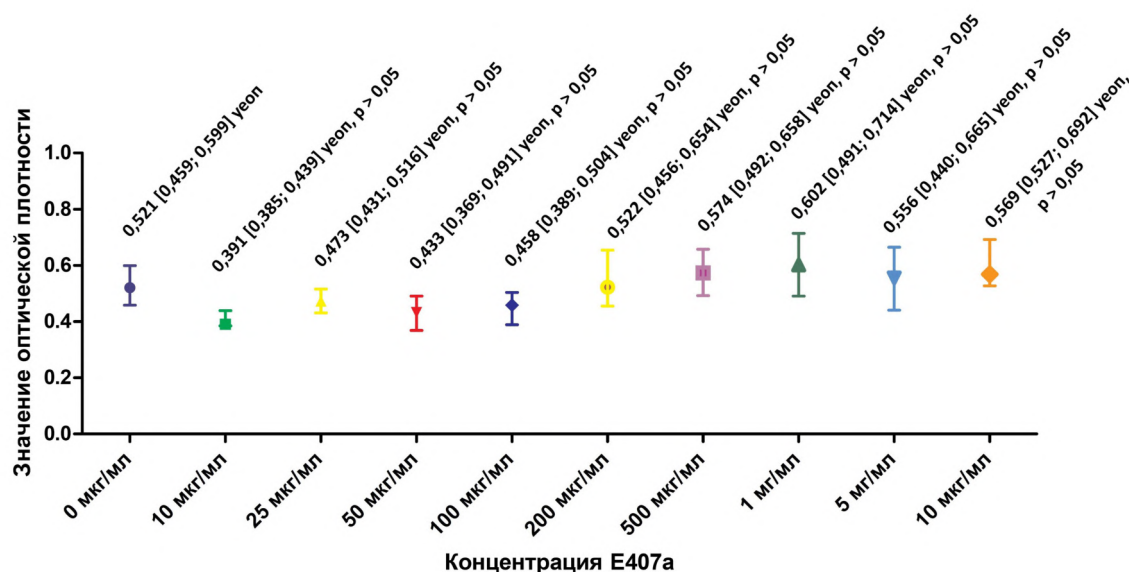


Рисунок 4 – Оценка жизнеспособности и метаболической активности клеток культуры печени эмбрионов крыс, которые были инкубированы с пищевой добавкой E407a в концентрациях от 0 до 10 мг/кг в течение 24 часов, с помощью МТТ теста. Числовые значения представлены в условных единицах оптической плотности (УЕОП).

клеток. Например, в данном исследовании каррагинан не вызывал изменений метаболической активности клеток культуры печени крыс вне зависимости от концентрации.

Обнаруженная нами повышенная способность клеток костного мозга и спленоцитов превращать МТТ в формазан под влиянием полуочищенного каррагинана может трактоваться либо как гиперактивация митохондрий, либо как увеличение общей митохондриальной массы вследствие активации биогенеза митохондрий. Показано, что под воздействием токсических экзогенных факторов даже при снижении количества функционирующих митохондрий может наблюдаться их гиперактивация, сопровождающаяся усиленным преобразованием солей тетразолия в формазан [14]. Таким образом, полученные нами результаты можно рассматривать в качестве компенсаторной гиперактивации метаболизма в митохондриях клеток костного мозга и селезенки репаративного характера в ответ на токсическое действие высоких концентраций пищевой добавки E407a.

Заключение

Непосредственное воздействие пищевой добавки E407a на спленоциты и клетки костного мозга в высоких концентрациях приводит к увеличению метаболической активности клеток.

Наиболее чувствительными к токсическому действию каррагинанов являются клетки костного мозга, а наименее – клетки фетальной печени.

Исследование выполнено в рамках НИР Харьковского национального медицинского университета (г. Харьков, Украина) «Биохимические механизмы индукции воспаления кишечника и средства его коррекции» (№ государственной регистрации 0120U102645).

The research was conducted within the frames of the research theme of Kharkiv National Medical University (Kharkiv, Ukraine) «Biochemical mechanisms of bowel inflammation induction and means of its correction» (№GR 0120U102645).

Литература

1. Re-evaluation of carrageenan (E 407) and processed Eucheuma seaweed (E 407a) as food additives? / M. Younes [et al.] // EFSA J. – 2018 Apr. – Vol. 16, N 4. – e05238.
2. Food-grade carrageenans and their implications in health and disease / F. Liu [et al.] // Compr. Rev. Food. Sci. Food. Saf. – 2021 Jul. – Vol. 20, N 4. – P. 3918–3936.
3. κ -Carrageenan Enhances Lipopolysaccharide-Induced Interleukin-8 Secretion by Stimulating the Bcl10-NF- κ B Pathway in HT-29 Cells and Aggravates C. freundii-Induced Inflammation in Mice / W. Wu [et al.] // Mediators Inflamm. – 2017. – Vol. 2017. – 8634865.
4. Tobacman, J. K. Review of harmful gastrointestinal effects of carrageenan in animal experiments / J. K. Tobacman // Environ

- Health Perspect. – 2001 Oct. – Vol. 109, N 10. – P. 983–994.
5. Carrageenan-induced colitis is associated with decreased population of anti-inflammatory bacterium, *Akkermansia muciniphila*, in the gut microbiota of C57BL/6J mice / Q. Shang [et al.] // *Toxicol. Lett.* – 2017 Sep. – Vol. 279. – P. 87–95.
6. Toll-like receptor 4 mediates induction of the Bcl10-NFκB-interleukin-8 inflammatory pathway by carrageenan in human intestinal epithelial cells / S. Bhattacharyya [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2008 Apr. – Vol. 283, N 16. – P. 10550–10558.
7. Molecular basis of carrageenan-induced cytokines production in macrophages / A. H. Lopes [et al.] // *Cell. Commun. Signal.* – 2020 Sep. – Vol. 18, N 1. – P. 141.
8. Semi-refined carrageenan promotes generation of reactive oxygen species in leukocytes of rats upon oral exposure but not in vitro / A. S. Tkachenko [et al.] // *Wien. Med. Wochenschr.* – 2021 Mar. – Vol. 171, N 3/4. – P. 68–78.
9. Effects of maternal thyroid hormone deficiency on differentiation of mesenchymal stem cells in CSF-exposed neonatal Wistar rats / V. Mafikandi [et al.] // *Acta Neurobiol. Exp. (Wars).* – 2019. – Vol. 79, N 3. – P. 270–275.
10. Nayak, S. Immunostimulant activity of noni (*Morinda citrifolia*) on T and B lymphocytes / S. Nayak, S. Mengi // *Pharm. Biol.* – 2010 Jul. – Vol. 48, N 7. – P. 724–731.
11. *Terfezia boudieri*: A Desert Truffle With Anticancer and Immunomodulatory Activities / M. F. Al Obaydi [et al.] // *Front. Nutr.* – 2020 Apr. – Vol. 7. – P. 38.
12. Hepatoblast and mesenchymal cell-specific gene-expression in fetal rat liver and in cultured fetal rat liver cells / T. Mansuroglu [et al.] // *Histochem. Cell. Biol.* – 2009 Jul. – Vol. 132, N 1. – P. 11–19.
13. van Meerloo, J. Cell sensitivity assays: the MTT assay / J. van Meerloo, G. J. L. Kaspers, J. Cloos // *Methods Mol. Biol.* – 2011. – Vol. 731. – P. 237–245.
14. Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition / Y. Rai [et al.] // *Sci. Rep.* – 2018 Jan. – Vol. 8, N 1. – P. 1531.
15. Effects of carrageenan on cell permeability, cytotoxicity, and cytokine gene expression in human intestinal and hepatic cell lines / J. M. McKim [et al.] // *Food. Chem. Toxicol.* – 2016 Oct. – Vol. 96. – P. 1–10.

*Поступила 30.06.2021 г.
Принята в печать 17.08.2021 г.*

References

1. Younes M, Aggett P, Aguilar F, Crebelli R, Filipič M, Frutos MJ, et al. Re-evaluation of carrageenan (E 407) and processed Eucheuma seaweed (E 407a) as food additives? *EFSA J.* 2018 Apr;16(4):e05238. doi: 10.2903/j.efsa.2018.5238
2. Liu F, Hou P, Zhang H, Tang Q, Xue C, Li RW. Food-grade carrageenans and their implications in health and disease. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2021 Jul;20(4):3918-3936. doi: 10.1111/1541-4337.12790
3. Wu W, Zhen Z, Niu T, Zhu X, Gao Y, Yan J, et al. κ-Carrageenan Enhances Lipopolysaccharide-Induced Interleukin-8 Secretion by Stimulating the Bcl10-NF-κB Pathway in HT-29 Cells and Aggravates C. freundii-Induced Inflammation in Mice. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:8634865. doi: 10.1155/2017/8634865 Epub 2017 Jan 9.
4. Tobacman JK. Review of harmful gastrointestinal effects of carrageenan in animal experiments. *Environ Health Perspect.* 2001 Oct;109(10):983-94. doi: 10.1289/ehp.01109983
5. Shang Q, Sun W, Shan X, Jiang H, Cai C, Hao J, et al. Carrageenan-induced colitis is associated with decreased population of anti-inflammatory bacterium, *Akkermansia muciniphila*, in the gut microbiota of C57BL/6J mice. *Toxicol Lett.* 2017 Sep;279:87-95. doi: 10.1016/j.toxlet.2017.07.904
6. Bhattacharyya S, Gill R, Chen ML, Zhang F, Linhardt RJ, Dudeja PK, et al. Toll-like receptor 4 mediates induction of the Bcl10-NFκB-interleukin-8 inflammatory pathway by carrageenan in human intestinal epithelial cells. *J Biol Chem.* 2008 Apr;283(16):10550-8. doi: 10.1074/jbc.M708833200
7. Lopes AH, Silva RL, Fonseca MD, Gomes FI, Maganin AG, Ribeiro LS, et al. Molecular basis of carrageenan-induced cytokines production in macrophages. *Cell Commun Signal.* 2020 Sep;18(1):141. doi: 10.1186/s12964-020-00621-x
8. Tkachenko AS, Kot YG, Kapustnik VA, Myasoedov VV, Makieieva NI, Chumachenko TO, et al. Semi-refined carrageenan promotes generation of reactive oxygen species in leukocytes of rats upon oral exposure but not in vitro. *Wien Med Wochenschr.* 2021 Mar;171(3-4):68-78. doi: 10.1007/s10354-020-00786-7
9. Mafikandi V, Roodbari NH, Nabiani M, Yaghmaei A. Effects of maternal thyroid hormone deficiency on differentiation of mesenchymal stem cells in CSF-exposed neonatal Wistar rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2019;79(3):270-275.
10. Nayak S, Mengi S. Immunostimulant activity of noni (*Morinda citrifolia*) on T and B lymphocytes. *Pharm Biol.* 2010 Jul;48(7):724-31. doi: 10.3109/13880200903264434
11. Obaydi MFA, Hamed WM, Kury LTA, Talib WH. *Terfezia boudieri*: A Desert Truffle With Anticancer and Immunomodulatory Activities. *Front Nutr.* 2020 Apr;7:38. doi: 10.3389/fnut.2020.00038
12. Mansuroglu T, Dudás J, Elmaouhoub A, Joza TZ, Ramadori G. Hepatoblast and mesenchymal cell-specific gene-expression in fetal rat liver and in cultured fetal rat liver cells. *Histochem Cell Biol.* 2009 Jul;132(1):11-9. doi: 10.1007/s00418-009-0596-y
13. van Meerloo J, Kaspers GJL, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol.* 2011;731:237-45. doi: 10.1007/978-1-61779-080-5_20
14. Rai Y, Pathak R, Kumari N, Sah DK, Pandey S, Kalra N, et al. Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. *Sci Rep.* 2018 Jan;8(1):1531. doi: 10.1038/s41598-018-19930-w
15. McKim JM, Baas H, Rice GP, Willoughby JA, Weiner ML, Blakemore W. Effects of carrageenan on cell permeability, cytotoxicity, and cytokine gene expression in human intestinal and hepatic cell lines. *Food Chem Toxicol.* 2016 Oct;96:1-10. doi: 10.1016/j.fct.2016.07.006

*Submitted 30.06.2021
Accepted 17.08.2021*

Сведения об авторах:

Ткаченко А.С. – к.м.н., доцент, директор НИИ экспериментальной и клинической медицины Харьковского национального медицинского университета;

Онищенко А.И. – к.м.н., заместитель директора НИИ экспериментальной и клинической медицины Харьковского национального медицинского университета;

Прокопюк В.Ю. – к.м.н., старший научный сотрудник, ведущий научный сотрудник НИИ экспериментальной и клинической медицины Харьковского национального медицинского университета.

Information about authors:

Tkachenko A.S. – Candidate of Medical Sciences, associate professor, Director of the Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, Kharkiv National Medical University;

Onishchenko A.I. – Candidate of Medical Sciences, Deputy Director of the Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, Kharkiv National Medical University;

Prokopiuk V.Yu. – Candidate of Medical Sciences, leading researcher of the Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, Kharkiv National Medical University.

Адрес для корреспонденции: Украина, 61022, г. Харьков, пр. Науки, 4, Харьковский национальный медицинский университет, НИИ экспериментальной и клинической медицины. E-mail: antontkachenko555@gmail.com – Ткаченко Антон Сергеевич.

Correspondence address: *Ukraine, 61022, Kharkiv, 4 Nauky ave., Kharkiv National Medical University, Research Institute of Experimental and Clinical Medicine. E-mail: antontkachenko555@gmail.com – Anton S. Tkachenko.*